



KONGERIKET NORGE
The Kingdom of Norway

Bekreftelse på patentsøknad nr
Certification of patent application no

1999 6336

► Det bekreftes herved at vedheftede dokument er nøyaktig utskrift/kopi av ovennevnte søknad, som opprinnelig inngitt 1998.12.23

► *It is hereby certified that the annexed document is a true copy of the above-mentioned application, as originally filed on 1998.12.23*

2003.07.17

Freddy Strømmen

Freddy Strømmen
Seksjonsleder

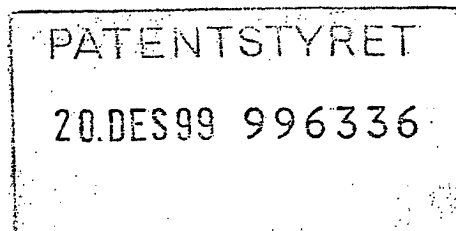
Line Reum

Line Reum



PATENTSTYRET®
Styret for det industrielle rettsvern

16



EK/KBN

17.12.99 20 DES. 1999

E10513

UTSKILT FRA SØKNAD nr. 19986133 av 23/12-1998

Preben Lexow
Fløensbakken 41A
5009 Bergen

Oppfinner:

Søkeren

Fremgangsmåte for sekvensanalyse

Foreliggende oppfinnelse er utskilt fra patentsøknad 19986133 som omfatter en metode for DNA-sekvensering som inneholder følgende trinn:

Første trinn tar utgangspunkt i en ren DNA-populasjon bestående av DNA-sekvensen som skal sekvenseres. DNA-molekylene kuttet/brekkes på en uspesifikk måte slik at det dannes en populasjon med DNA-molekyler bestående av biter (heretter kalt DNA-biter) av den opprinnelige sekvensen.

Annet trinn består i å erstatte baseparene i DNA-bitene med 4 ulike DNA-sekvenser (heretter kalt DNA-fragmenter) som representerer hver av de fire basene adenin, cytosin, guanin og tymin. Der hvor det har vært basepar A-T, settes det altså inn "fragment A", C-G byttes ut med "fragment C" osv. Dermed genereres nye DNA-molekyler hvor den opprinnelige baserekkefølgen på f.eks. ACGTT... erstattes med fragment A - fragment C - fragment G osv. Lengden på disse fire DNA-fragmentene kan i prinsippet variere i lengde fra 2bp til flere hundre kbp (eller mer om ønskelig), alt etter behov. Tilsvarende kan DNA-fragmentene inneholde reportergener og annen biologisk informasjon eller kun bestå av sekvenser uten kjent biologisk funksjon.

I tredje trinn avleses rekkefølgen av de fire typene DNA-fragmenter for hvert enkelt DNA-molekyl. Dermed finner man baserekkefølgen i de opprinnelige DNA-bitene indirekte.

I fjerde trinn benytter et dataprogram overlappen mellom DNA-bitene til å sette sammen informasjonen fra trinn 3 til sekvensen på DNA-sekvensene som ble brukt som utgangspunkt.

Foreliggende oppfinnelse omhandler fremgangsmåter hvor en bruker vinkelrette plater til å feste oligonukleotider, elektrisk utretting av DNA og utretting av DNA ved hjelp av gelbaserte metoder.

Bruk av vinkelrette plater til å feste oligonukleotidene

I mange sammenhenger er det behov for å feste molekyler på en rett linje. F.eks. for enkelte av sekvenseringsmetodene på fast matrix beskrevet i patentsøknad nr. 19986133. Som alternativ til å feste molekylerne på en linje kan man bruke en vinkelrett plate (fig1). Sett ovenfra vil molekyler som fester seg til en slik plate vil fortone seg som en rett linje. Bruk av vinkelrette plater i stedet for linjer har bl.a. den fordelen at arealet som molekylerne kan feste seg til blir større slik at man får festet flere molekyler.

Et annet viktig poeng er at platene kan inndeles i ruter med ulike oligonukleotider. Ved å bruke festemekanismen beskrevet tidligere i patentsøknaden kan man dermed sekvensere flere ulike gener/ sekvenser parallelt.

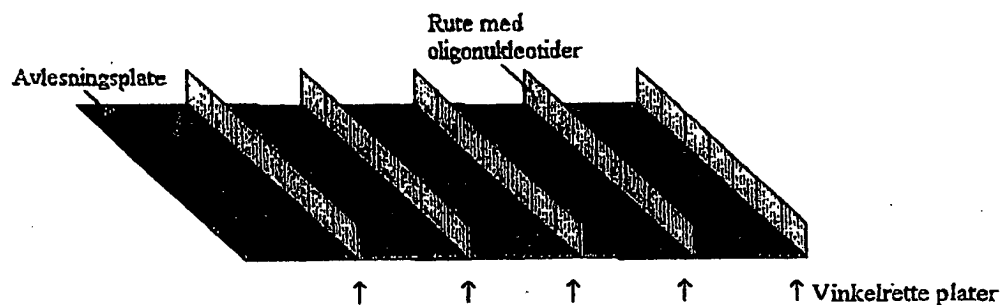
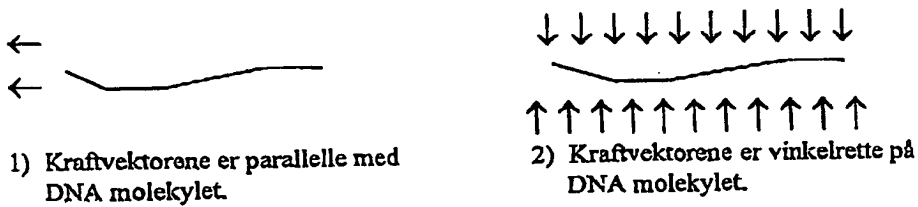


Fig 1 Vinkelrette plater for å feste oligonukleotider. I dette eksempelet er platene inndelt i ruter med ulike oligonukleotider slik at man kan utføre mange sekvensreaksjoner parallelt.

Elektrisk utretting:

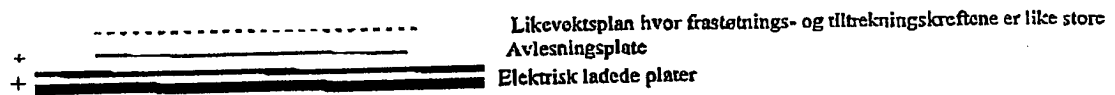
Utretting av et DNA molekyl kan i prinsippet gjøres på to måter:



Alle utrettingsmetoder jeg har funnet i litteraturen er basert på førstnevnte prinsipp. F.eks. har det vært brukt elektrisitet til å lage positive ladningsfelt med parallelle kraftlinjer. Tilsvarende vil utretting med væskestrøm, gravitasjon, o.l. utsette DNA molekylene for drag som virker parallelt med molekylene. Ulempen med disse teknikkene er at kraften på DNA molekylenees feste til underlaget øker proporsjonalt med både DNA molekylenees lengder og størrelsen på kraftvektoren. Dermed begrenses lengden på DNA molekyler som kan rettes ut. Videre vil størrelsen på kraftvektorene måtte begrenses noe som igjen påvirker hvor rette DNA molekylene blir.

Ved å bruke strategier som er basert på prinsipp 2) alene eller i kombinasjon med prinsipp 1) kan man redusere kraften som virker på DNA molekylenees feste til underlaget. Dermed kan man øke lengden på DNA molekyler som strekkes ut samtidig som de blir rettere. I fig. 21b) i den siste versjonen av patentsøknaden illustreres en slik metode. Nedenfor følger to andre strategier som kan beskrives i patentsøknaden:

1)



To elektrisk ladede plater plasseres under avlesningsplaten hvor DNA molekylene skal strekkes ut. Den øverste platen har en svak negativ ladning mens den nederste har en relativt sterk positiv ladning. Hvis man plasserer en negativt ladd partikkel (f.eks. DNA) rett over den negative platen vil frastøtningskreftene fra denne være større enn tiltrekningskreftene fra den positive platen. Partikkelen vil dermed presses oppover. Høyere oppe derimot vil forholdene være motsatt; Den positive platens tiltrekkingskraft er større enn den negative platens frastøtningskraft. Ved å tilpasse platenes ladninger vil det dermed inntre en likevekt mellom frastøtnings- og tiltrekkingskrefter i en gitt høyde over avlesningsplaten. DNA molekylene vil presses inn i dette likevektsplanet. Et viktig poeng er at nettokraften på DNA molekylene er lik null så lenge de befinner seg i likevektsplanet. Dermed reduseres sjansen for at de skal ryke.

I tillegg til de to ladede platene vist ovenfor kan man ha en positiv ladning til venstre for avlesningsplaten. Dermed får man en netto kraft i denne retningen. Det samme kan oppnås ved å skråstille de to ladde platene i forhold til hverandre og i forhold til avlesningsplaten. To ytterligere fordeler med denne metoden må nevnes: 1) Skarpheten på fluorescensavlesningen øker fordi alle DNA molekylene ligger i det samme planet, og 2) DNA molekylene presses vekk fra avlesningsplaten slik at de ikke ryker p.g.a friksjon mot underlaget.

- 2) Hvis DNA molekyler skal bevegges i utstruktet form gjennom et flow cytometer eller lignende kan man bruke et negativt ladet rør. DNA molekyler vil dermed presses inn mot midten av røret hvor frastøtningskreftene er minst.

Mekanisk utrettingsstrategi:

Hvis man ønsker å sekvensere et DNA molekyl på f.eks. 1 MB kan man plassere to plater ved siden av hverandre. På den ene platen er det festet oligonukleotider som komplementerer den ene enden av DNA molekylet på en rute på f.eks. 10x10 mikrometer. På den andre platen er det en tilsvarende rute med oligonukleotider som komplementerer den andre enden på DNA molekylet som skal sekvenseres. Ved hjelp av hybridisering kan man dermed feste mål DNA'en med en ende på hver plate. Hvis platene deretter trekkes fra hverandre med noen få mm vil DNA molekylerne rettes ut. Deretter kan de forankres til underlaget slik som foreslått i den sykliske sekvenseringsstrategien beskrevet nedenfor.

Syklisk sekvensering strategi:

Sekvensering med prinsippet som er illustrert i fig1, dokument8 (innsendt 21/3) kan kombineres med en syklisk strategi hvor man først ligerer inn en adapter som f.eks. konverterer 4 basepar, deretter avleser man sekvensinformasjonen før man til slutt kutter vekk adapteren slik at man kan gjenta prosedyren med de 4 neste baseparene, osv.

For å vite hvilke sekvensfragmenter som hører sammen fra syklus til syklus er det viktig at de konverterte fragmentene befinner seg på samme lokalisasjon gjennom alle syklusene. Dette kan oppnås ved at man forankrer de utstrakte DNA molekylerne til underlaget. Det kan f.eks. gjøres ved å innkorporere biotinmerkede baser i DNA molekylerne med ca. 1000 bp mellomrom. Hvis underlaget samtidig er dekket med streptavidin kan DNA molekylerne dermed forankres. Andre strategier kan være å utnytte at DNA har en naturlig evne til å feste seg til glass, bruke DNA bindende proteiner og antistoffer rettet mot disse, mm.

Gelbaserte metoder

Elektroforesegeler har egenskaper som kan utnyttes sammen med konverterings- og utrettings- prinsippene som er omtalt tidligere. For det første er de velegnet til å sortere DNA og andre molekyler etter størrelse. Videre at DNA molekylerne både rettes og strekkes ut inne i gelmatrixen (Stellwagen; Biochemistry 1988, 27:6417-6424). F.eks. har Schwartz et al. (Science 1993, 262:110-114) utnyttet dette til å strekke ut DNA molekyler i agarosegeler i forbindelse med «optical mapping». Til tross for at DNA molekylerne lå i en agarosegel var det mulig å observere de enkelte molekylerne direkte med fluorescens mikroskopi. Nedenfor følger eksempler på hvordan disse egenskapene kan utnyttes til sekvensering:

Avlesning i gel:

Gelelektroforese kan brukes til å rette ut DNA som alternativ til andre utrettingsmetoder. Gelelektroforese kan derfor anvendes på alle de metodene som er beskrevet tidligere i patentsøknaden. Hvis man i tillegg ønsker å utnytte elektroforesens evne til å størrelsessortere DNA molekyler kan man f.eks. anvende følgende strategi:

- 1) Man lager en DNA stige som består av alle lengder av DNA sekvensen. F.eks. kan man feste den ene enden av DNA molekylerne til et underlag før man kutter dem med DNaseI.

Etter å ha vasket vekk de avkuttete fragmentene kan man løse DNA molekylene slik at man har en løsning med DNA molekyler som er like i den ene enden mens de varierer i den andre enden avhengig av hvor de har blitt kuttet. Det samme kan oppnås med en rekke andre strategier, bl.a. med hjelp av primere og polymeraseekstensjoner.

- 2) Endene som er kuttet konverteres, f.eks. ved hjelp av teknikkene som er beskrevet tidligere i patentsøknaden. Fragmentene merkes med fluorescens, f.eks. fluorescerende prober.
- 3) DNA molekylene kjøres på en elektroforesegel.
- 4) Når molekylene er separert kan man analysere gelen med en fluorescensscanner, mikroskop eller lignende. Fragmentsammensetningen av de konverterte endene kan dermed avleses direkte fordi DNA molekylene er rettet ut. Samtidig vil lokalisasjonen i gelen gi informasjon om sekvensbitens plass på DNA molekylet som sekvenseres. F.eks. vil en sekvensbiter i begynnelsen av DNA molekylet migrere langt mens sekvensbiter i slutten av DNA molekylet migrere kort.

Hvilken elektroforesemetode man bør anvende tilpasses størrelsen på DNA molekylet som skal sekvenseres. F.eks. kan man bruke vanlig agarosegel for sekvenser på noen få kilobase mens pulsed field elektroforese kan brukes ved lengre sekvenser.

Elektroforese forut for avlesning:

En annen strategi er å bruke elektroforesegeler til størrelsessortering mens avlesningen gjøres etter at DNA molekylene har forlatt gelen. Et eksempel på en slik innretning er illustrert nedenunder:

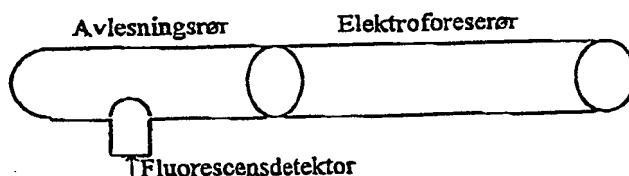


Fig 3 DNA molekylene trekkes gjennom en sylinderformet gel i elektroforeserøret ved hjelp av et elektrisk felt som går parallelt med røret. Avlesningsrøret består av et hult, negativt ladet metallrør. Når DNA molekylene kommer inn i avlesningsrøret vil de presses inn mot midten pga den negative ladningen i røret. Samtidig trekkes DNA molekylene mot venstre av et felt som går parallelt med røret på samme måte som i elektroforeserøret. DNA molekylene passerer derfor fluorescensdetektoren i utstruktet form slik at fragmentsammensetningene kan avleses. De sekvensbitene som avleses først kommer fra den første delen av DNA molekylet som sekvenseres mens de som avleses sist kommer fra den siste delen.

Separeringen kan naturligvis også gjøres med en rekke andre metoder enn gelsortering. F.eks. kapillærelektroforese.

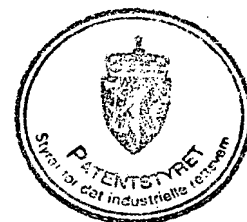




P a t e n t k r a v

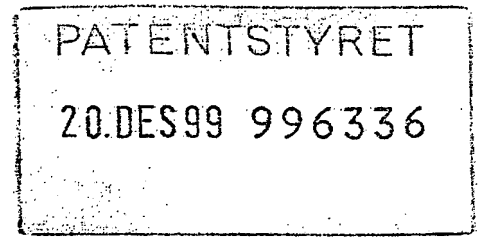
1.

Fremgangsmåte for sekvensanalyse, k a r a k t e r i s e r t v e d
beskrivelsen



1e

20 DES. 1999



Sammendrag

Fremgangsmåte for festing av oligonukleotider og utretting av molekyler til bruk ved sekvensanalyse.

